

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Hana Kyliánková**

Telomery jako ukazatel stáří a stárnutí organismu u ptáků  
Telomeres as indicators of chronological and functional age and ageing in birds

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Tereza Králová

Praha, 2017



Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2017



## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. za ochotu, podnětné připomínky a celkovou pomoc při vypracování této bakalářské práce. Rovněž děkuji své konzultantce Mgr. Tereze Králové za neskutečně pozitivní přístup a poskytnutí značného množství článků. Dík patří i mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali, speciálně pak mé sestře Mgr. Stanislavě Dlouhé, která z práce odstranila gramatické nedostatky.



## Abstrakt

Vysvětlení procesu stárnutí patří ke stěžejním tématům evoluční biologie. V první části této bakalářské práce je podán přehled hlavních evolučních hypotéz souvisejících s teorií stárnutí a dále přehled proximálních mechanismů, které se stárnutím souvisí. Pozornost je věnována především telomerám a jejich zkracování. Telomery jsou nekódující, repetitivní sekvence DNA chránící konce eukaryotických chromozomů před poškozením. V klasických somatických buňkách se při každém buněčném dělení zkracují, až dokud nedosáhnou kritické hodnoty (tzv. Hayflickova limitu). Poté buňka prochází replikativní senescencí a k dalšímu dělení již nedochází. Na jejich zkracování má ale vliv i celá řada dalších faktorů (stres, reprodukce, vnější podmínky, onemocnění, parazitace aj.). Předpokládalo se proto, že by se na základě délky telomer dal odhadnout věk organismu. Zejména v posledních letech se však ukazuje, že spíše než k určování chronologického (tedy skutečného věku) jedinců, by se telomery daly použít pro odhad „biologického věku“. V práci jsou nastíněny hlavní metody stanovení délky telomer a diskutovány výhody i nevýhody, které jejich využití přináší. Dále jsou diskutovány práce využívající stanovení délky telomer v ekologickém kontextu u ptáků.

**Klíčová slova:** Telomery, stárnutí, qPCR, ptáci, oxidativní stres





## **Abstract**

The explanation of ageing processes belongs to the most challenging topics in evolutionary biology. This bachelor thesis provides a basic summary of evolutionary hypotheses of ageing, along with an overview of proximate ageing mechanisms. Main focus is on telomeres and the dynamics of their shortening. Telomeres are non-coding, repetitive sequences of DNA protecting the ends of eukaryotic chromosomes against degradation. They usually shorten with each cell division in most somatic cells until they reach the critical limit (the so called Hayflick limit), when the cell undergoes the replicative senescence and does not divide anymore. Various factors, such as physiological/oxidative stress, stage of reproduction/reproductive investments, and diseases/parasites, can influence telomere length dynamics. Recent studies indicate that telomere length is a useful biomarker for estimating functional, or biological age, but at the same time length of telomeres cannot be used to estimate chronological age. Molecular methods which can be used to measure telomere length, and their potential limitations, are also discussed in this thesis. Finally, I provide an overview of studies focusing on telomere dynamics in bird-oriented research.

**Key words:** Telomeres, ageing, qPCR, birds, oxidative stress



# Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. TEORIE STÁRNUTÍ.....	2
3. TELOMERY A JEJICH ZKRACOVÁNÍ.....	6
4. MĚŘENÍ DÉLKY TELOMER.....	8
4.1 TRF (Terminal Restriction Fragment).....	8
4.2 Q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction).....	8
4.3 FISH metody.....	10
4.4 STELA (Single Telomere Length Analysis).....	10
4.5 T-OLA (Telomeric-oligonucleotide Ligation Assays).....	11
5. TELOMERY JAKO BIOMARKERY STÁRNUTÍ.....	12
6. DYNAMIKA DÉLKY TELOMER.....	14
6.1 Raná ontogeneze.....	14
6.2 Stres.....	16
6.3 Reprodukce.....	17
6.4 Strava.....	18
6.5 Onemocnění a parazitace.....	18
6.6 Dědičnost.....	20
6.7 Vnější podmínky.....	21
6.8 Chování.....	23
7. ZÁVĚR.....	24
8. LITERÁRNÍ ZDROJE.....	26

# 1. ÚVOD

Stárnutí (také senescence či ageing) je proces, který fascinuje evoluční biology po celém světě, neboť je z hlediska individuální fitness těžké vysvětlit, proč vlastně ke stárnutí organismu dochází. Stárnutí začíná již při početí jedince, přičemž je pro většinu mnohobuněčných organismů nevyhnutelné a projevuje se postupným chátráním tělesné schránky a snižováním celkové vitality jedince. Nižší efektivita fungování organismu se projevuje poklesem účinné obrany proti nahromaděným chybám, což vede k vyšší náchylnosti k různým nemocem až ke smrti jedince (pakliže neumírá předčasně z jiných důvodů; Troen, 2003). Zároveň také s přibývajícím věkem dochází ke snížení reprodukčního úspěchu (Ricklefs, 2008). Stárnutí je klíčovou otázkou současné ekologie zejména proto, že dlouhověká zvířata mají teoreticky více příležitostí k rozmnožování, tudíž zvýšená míra přežití, respektive dlouhý život, by měl být preferován přírodním výběrem (Williams, 1957; Hamilton, 1966). Přesto tomu tak v mnoha případech není a u většiny taxonů dokonce převládají krátkověcí jedinci nad těmi dlouhověkými (Wasser & Sherman, 2010). V posledních letech je tudíž úsilí věnováno nalezení univerzálního biomarkeru, který by jasně poukazoval na věk jedince a zároveň by mohl sloužit k určení maximální možné délky života. V přírodě totiž existuje obrovské rozpětí délek života. Velmi známým příkladem extrémní krátkověkosti jsou jepice, jejíž dospělci se dožívají pouhých tří dnů. Opačně je na tom např. mlž *Arctica islandica* s maximálním věkem až 507 let. Mimo to, že existuje obrovské rozpětí délek života u různých druhů, liší se toto rozpětí také vnitrodruhově. Například královna včely medonosné (*Apis mellifera*) žije v porovnání s dělnicemi zhruba šestkrát déle (Hughes & Reynolds, 2005). Studium biomarkerů stárnutí je tedy klíčové pro pochopení dynamiky stárnutí jak v rámci populací, tak i na mezidruhové úrovni. Zároveň by se s jejich pomocí mohla rozklíčovat i diverzita životních strategií, které jsou dány právě tím, jak druh dělí energii na investici do přežití a do rozmnožování (shrnutí ve Vleck *et al.*, 2007).

Doposud bylo publikováno několik teorií zabývajících se možným mechanismem stárnutí, přičemž zájem se soustředí na hledání vhodného biomarkeru. Z nejznámějších např. endokrinní teorie, která za klíčovou považuje insulin/IGF-1 signální dráhu. Insulin je sice v normální míře nezbytně důležitý, může ale negativně působit na délku života, protože má vliv na produkci volných kyslíkových radikálů (Lambert a Merry, 2004). Mezi další potencionální biomarkery patří také oxidativní poškození způsobené volnými kyslíkovými radikály. Ty vznikají jako vedlejší produkty při mnoha metabolických

procesech a jejich vzrůstající koncentrace má za následek zhoršení fyziologického stavu jedince (Finkel a Holbrook, 2000). Dále stojí v centru pozornosti tzv. teorie hromadění defektů DNA, kdy je stárnutí urychlováno množstvím chyb při replikaci (Troen, 2003). V neposlední řadě se v současnosti velice intenzivně studuje tzv. teorie zkracování telomer (Haussmann a Vleck, 2002). A právě telomerám jako potencionálnímu biomarkeru se bude blíže věnovat tato práce.

Vzhledem k počtu v minulosti formulovaných hypotéz a teorií stárnutí je jasné, že stárnutí je velice složitý proces, který dosud není plně prozkoumán. Délku života výrazně ovlivňuje řada vnějších (životní podmínky, stravovací návyky, predace, parazitace, reprodukce atd.), ale i vnitřních (stres, oxidativní poškození, vliv genetiky, délka telomer apod.) podmínek. V této bakalářské práci se pokusím 1) podat krátký přehled teorií týkajících se vysvětlení stárnutí se zaměřením na teorii zkracování telomer, 2) sepsat přehled metodiky týkající se stanovení délky telomer a to především za použití studií zabývajících se ptačím modelem, 3) vytvořit ucelený pohled na vztah mezi délkou telomer a stárnutím (zda jsou či nejsou vhodnými biomarkery stáří) u ptáků jako modelové skupiny, 4) určit, jaká je dynamika zkracování telomer u vybraných ptačích druhů.

Modelovou skupinou této práce jsou ptáci a to z několika důvodů. Zpravidla žijí déle než savci obdobné velikosti, přestože mají rychlejší bazální metabolismus (tomuto jevu se budu blíže věnovat v kapitole 2). Jedná se o druhově bohatou skupinu s širokým areálem výskytu a rozmanitou délkou života. Jejich základní životní zvyky jsou navíc poměrně dobře zmapovány, a to i díky zájmu laiků (Wasser & Sherman, 2010).

## 2. TEORIE STÁRNUTÍ

V první řadě je třeba odlišit dva základní přístupy, s nimiž je na stárnutí nahlíženo. Evoluční biologové si kladou otázku „proč“ stárneme a také „proč“ se stárnutí tak markantně liší na různých úrovních. Naopak v rámci gerontologie jsou v centru pozornosti proximální příčiny stárnutí. Nejdříve se budu věnovat evolučnímu pohledu.

V současnosti je velké úsilí věnováno formulaci obecné hypotézy, která by pomohla pochopit příčiny stárnutí, přičemž v minulosti byly vysloveny na toto téma tři stěžejní evoluční hypotézy. Všechny jsou založeny na obecném předpokladu, že starší jedinci jsou více náchylní k úmrtí způsobenému vnějšími (extrinsic) faktory (ať už se jedná o vyšší zájem ze strany predátorů, o různé nemoci či vyšší riziko nehody), což u nich výrazně snižuje pravděpodobnost rozmnožování. A protože jedinec mnohem pravděpodobněji

zemře následkem těchto vnějších vlivů, než že by dosáhl maximálního života, který mu teoreticky umožňuje jeho fyziologický stav, tlak přírodního výběru na fyziologicky funkční organismus již není v pokročilém věku tak silný. Jedinec tedy energii do rozmnožování a reparačních mechanismů investuje převážně jen na začátku života.

První z hypotéz říká, že za zhoršení fyziologického stavu jedince je zodpovědné nahromadění mutací v průběhu života (teorie hromadění mutací; Medawar, 1952). Williamsova teorie stárnutí naopak tvrdí, že vybrané mutace jsou v rané fázi života nezbytné a přináší jedinci výhody a až později (starému organismu) škodí (antagonistická pleiotropní teorie; Williams, 1957). Třetí hypotéza předpokládá, že stárnutí je způsobeno nahromaděním chyb v buňkách a tkáních a vzhledem k tomu, že jedinec musí dělit investice mezi reprodukci a opravy vlastního těla, k opravám takových chyb může docházet jen po určitou dobu (teorie o regulaci somatické údržby; Kirkwood, 1977). Právě posledně zmiňovaná teorie je v současnosti asi nejpřijímanější.

Všeobecně tedy byla po dlouhou dobu přijímána tzv. klasická evoluční teorie, která předpokládá, že dlouhověcí jedinci by měli mít více příležitostí k rozmnožování, tudíž by přírodní selekcí měla být preferována adaptace na vyšší míru přežití a následně delší život, který by jedinci umožnil více rozšířit své geny (Williams, 1957; Hamilton, 1966). Zároveň říká, že jsou to právě vnější faktory, které zodpovídají za to, že některé druhy stárnou rychleji (dožívají se nižšího věku) a jiné pomaleji (dožívají se vyššího věku). Např. u ptáků byla tato teorie podpořena, neboť bylo zjištěno, že za mezidruhovou variabilitou v délce života stojí vnější faktor – predáční tlak. Čím nižší je predáční riziko, které ovlivňuje dožití průměrného jedince v populaci, tím delšího maximálního věku se jedinci obecně (ať už ve volné přírodě či v zajetí) dožívají, čili druhy vystavené menšímu predáčnímu tlaku jsou vnitřně nastaveny na delší délku života (Valcu *et al.*, 2014). Recentně ale někteří poukazují na to, že pokud predace není stochastická (tedy náhodná), ale cílená a pravděpodobnost přežití je ovlivněna kondicí jedince a jeho schopností uniknout predátorovi, pak přirozená délka života jedinců z oblastí, kde působí predáční tlak může být vyšší než tam, kde tento tlak (a tedy selekce na kvalitu jedinců) nepůsobí (Chen a Maklakov, 2012).

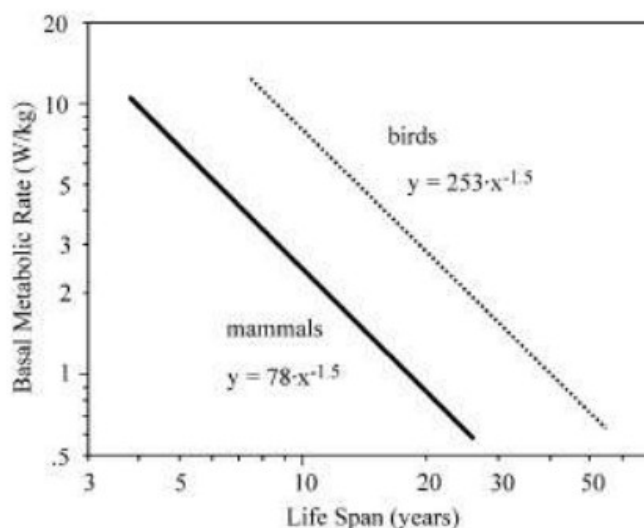
Právě proto, že predace je jedním z hlavních vnějších faktorů ovlivňujících mortalitu, se nabízí otázka, zda by ji nebylo možno omezit tím, že by jedinci více investovali do růstu vlastního těla (Ricklefs, 2010a). Predátor je totiž obvykle větší než jeho kořist (Cohen *et al.*, 1993). Vybrané experimenty nicméně prokázaly, že větší tělo

nemusí nutně znamenat delší život – tak tomu bylo např. u myši (Miller *et al.*, 2002). O tom, že vnější mortalitní faktory patrně stojí za selekcí na přirozenou délku života, svědčí to, že dlouhověkost se vyskytuje často u druhů žijících na stromech (Shattuck a Williams, 2010), majících možnost chemické obrany (Blanco a Sherman, 2005), hibernujících (Turbill, 2011) či eusociálních (Keller a Genoud, 1997), které jsou vystaveny mírnějšímu predančnímu riziku. Všechny tyto adaptace pozitivně korelují s délkou života, a přesto jsou na velikosti těla nezávislé (Valcu *et al.*, 2014). Pakliže je jedinec vystaven většímu tlaku ze strany predátorů, je alternativou nikoliv investice do vlastního těla, ale spíše do rychlosti reprodukce, což ostatně prokazují i experimenty prováděné na savcích i ptácích (Salo *et al.*, 2010). Krátce žijící druhy s velkou mortalitou by se tedy měly rychleji rozmnožovat (Salo *et al.*, 2010).

Klasické teorie stárnutí předpokládají, že s věkem roste riziko mortality, ale klesá plodnost (Medawar, 1952; Williams, 1957; Kirkwood, 1977). Recentní studie shrnula poznatky výzkumů různých druhů zvířat (ale i rostlin) a naznačuje, že v rámci života je variabilita v relativní mortalitě a fertilitě obrovská, a to i v rámci jedné skupiny (například u ptáků) a nepodporuje tak klasický pohled. Je možné, že tato překvapivá variabilita ve strategii stárnutí a rozmnožování je také ovlivněna vnějšími faktory prostředí, se kterými se musí jednotlivé druhy vyrovnat, konkrétní analýza však chybí (viz také Jones *et al.*, 2014).

Ke klasickému evolučnímu pohledu existuje alternativní přístup, kterým je na stárnutí nahlíženo a ten je patrně pro studium dynamiky telomer relevantnější. V gerontologickém výzkumu je velice populární zaměření na proximální mechanismy stárnutí, které si kladou otázku „jak“ stárneme a v centru zájmu jsou v tomto případě specifické mechanismy, které charakterizují, co se děje s jedinci v průběhu stárnutí; jak se stárnutí projevuje a co se odehrává v organismu starého jedince. Teorií publikovaných na toto téma jsou v současnosti stovky a některé z nich byly nastíněny již v úvodu. Za jednu z hlavních příčin poškození nezbytně důležitých složek organismu (DNA, proteinů a lipidů) jsou považovány volné radikály a další reaktivní kyslíkaté a dusíkaté sloučeniny (Harman, 2006; Monaghan *et al.*, 2008). Tyto radikály vznikají primárně na membránách mitochondrií jako vedlejší produkty při mnoha metabolických procesech a v určitém množství jsou nezbytné pro udržení homeostáze (Finkel a Holbrook, 2000). Z toho důvodu vznikl předpoklad, že na mezidruhové (ne však vnitrodruhové) úrovni jsou jedinci s vyšší hodnotou bazálního metabolismu díky tomu vystaveni i vyššímu

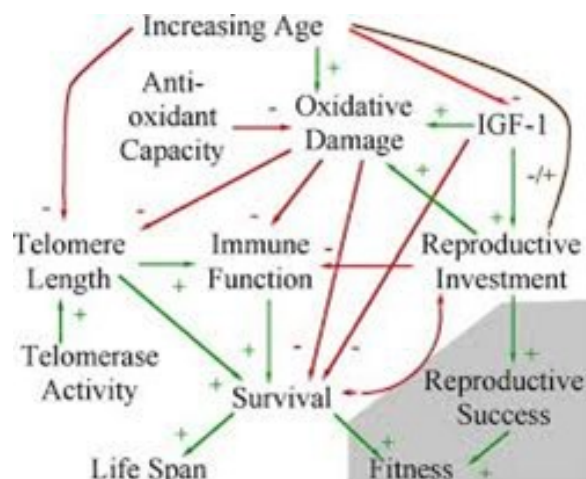
oxidačnímu stresu, což v důsledku znamená, že žijí kratší dobu než jedinci s nižší hodnotou. Menší zvířata mají rychlejší bazální metabolismus, tudíž žijí „rychle, ale krátce“ (rate of living teorie; Pearl, 1928; Speakman *et al.*, 2002). Z této teorie však existují výjimky, např. ptáci mají rychlejší metabolismus než savci stejné velikosti, a přesto žijí déle (graf 1; Speakman, 2005b). Podobně jsou na tom i netopýři, kteří žijí až šestkrát déle než srovnatelně velcí savci (Brunet-Rossinni & Austad, 2004).



*Graf 1: Hodnota bazálního metabolismu (osa y) a délka života (osa x) u ptáků (přerušovaná linie) a u savců (nepřerušovaná linie; převzato z Vleck *et al.*, 2007).*

Na poškození organismu však nemají vliv pouze volné kyslíkové radikály, ale i celá řada dalších faktorů – např. nestabilita jaderné i mitochondriální DNA, chyby v transkripci a translaci, snížená účinnost imunitního systému v průběhu života či zkracování telomer (poslední dva zmíněné však mohou být jak příčinou, tak důsledkem stárnutí; Vleck *et al.*, 2007). Všechny uvedené faktory přitom na sobě nejsou nezávislé; mohou se vzájemně ovlivňovat (obr. 1). Telomerám, teorii zkracování a zejména jejich dynamice v ptačích populacích se budu podrobněji věnovat v následujících kapitolách.





Obr. 1: Přehled faktorů ovlivňujících rychlost stárnutí pozitivně (zelené), negativně (červené) či měnících se s věkem (hnědé) u ptáků. Interakce mezi těmito faktory v šedé oblasti určují reprodukční úspěch a rozdíl ve fitness u jedinců v rámci druhu. Interakce v bílé oblasti jsou hypotetickými faktory, které ovlivňují mezidruhové rozdíly v délce života; převzato z Vleck *et al.*, 2007).

### 3. TELOMERY A JEJICH ZKRACOVÁNÍ

Toho, že se na koncích chromozomů nacházejí specifické struktury, které je chrání před fúzí, si povšimli vědci již ve třicátých letech (McClintock, 1939; Muller, 1938). Mullerem pak byly tyto struktury nazvány telomery, což je výraz pocházející ze dvou řeckých slov – „telos“ (konec) a „meros“ (část; Muller, 1938). Telomery jsou vysoce konzervativní, nekódující, repetitivní sekvence DNA, které tvoří koncové úseky eukaryotických chromozomů. U prokaryot je obvykle nenalézáme, protože nemají lineárně uspořádanou DNA. Struktura repetitivní sekvence je velmi obdobná u všech taxonů, u obratlovců jde konkrétně o krátkou sekvenci bohatou na guanin 5'-TTAGGG-3'. U člověka se pak tato hexanukleotidová sekvence opakuje až 2000krát (Meyne *et al.*, 1989). Kromě DNA obsahují telomery ještě proteinovou složku, skládající se ze skupiny proteinů (mezi nimi např. TRF1 a TRF2), které vytváří komplex, jež má za úkol chránit telomery před degradací (Broccoli *et al.*, 1997). Bylo potvrzeno, že telomery jsou klíčovými strukturami chromozomů, ochraňují je před poškozením a při replikaci rovněž zabraňují ztrátám oblastí nesoucích geny. Při absenci telomer by byly koncové úseky chromozomů rozpoznány jako dvoušroubovicové zlomy, což by mohlo vést k fúzi chromozomů (Blackburn, 1991).

Při každém buněčném dělení se telomery o určitý úsek zkracují. Důvodem je neschopnost DNA-polymerázy (enzymu odpovědného za replikaci DNA) provést replikaci volné části telomery do úplného konce, čímž vzniká určitý jednovláknový přesah (Sedivy, 1998; Samassekou *et al.*, 2010). Každé z vláken původní templátové DNA je replikováno odlišným způsobem, protože DNA polymeráza pracuje pouze ve směru 5' - 3'. Vzhledem k tomu, že je DNA antiparalelní, postupuje po jednom řetězci (vedoucí řetězec = leading strand) DNA polymeráza zcela normálně, kdežto druhý (opožďující se řetězec = lagging strand) replikuje po malých částech, tzv. Okazakiho fragmentech, které jsou později DNA ligázou pospojovány do souvislého vlákna, takže jsou od vedoucího řetězce nerozpoznatelné. Jako počáteční místo replikace slouží tzv. primer (krátký řetězec RNA), ke kterému enzym DNA-polymeráza přidává nové nukleotidy podle sekvence původního vlákna (tzv. templátu). Vzhledem k tomu, že je DNA-polymeráza schopna přidávat nukleotidy pouze k 3' konci, na 5' konci nenahrazuje odstraněné sekvence primeru, což má za následek zkracování tohoto konce. Na základě tohoto poznatku byla formulována teorie, podle níž mohou buňky během svého života provést jen určitý počet dělení, obvykle zhruba 50-80 (Hayflick a Moorhead, 1961). Tato hodnota se nazývá Hayflickův limit a udává, kolika buněčných dělení je somatická buňka za svůj život schopná (Semassekou *et al.*, 2010). Po dosažení tohoto limitu (překročení kritické délky telomer) může buňka projít tzv. replikativní senescencí a dále se nedělit (Harley *et al.*, 1992). Některé buňky se však v organismu dělí neustále (kmenové, nádorové) díky působení enzymu telomeráza, který obnovuje telomerické repetice a zabraňuje tak jejich zkracování. Funkce tohoto enzymu je ovšem v klasických somatických buňkách zablokována (shrnutí ve Wai, 2004). Telomeráza je ribonukleoprotein, který pracuje na principu reverzní transkriptázy (Lingner *et al.*, 1997).

Délku telomer (respektive rychlost jejich zkracování) samozřejmě ovlivňuje řada dalších faktorů. V popředí zájmu je zejména oxidační stres, protože způsobuje zlomy v G-bohatém jednovláknovém přesahu (von Zglinicki, 2000), dále také fyziologický stres řízený glukokortikoidy (Hausmann & Marchetto, 2010) a rychlejší zkracování telomer je rovněž spojováno s migrací a reprodukčním úsilím (Schultner *et al.*, 2014). Dále je ještě zapotřebí zmínit, že zkracování telomer není v průběhu života jedince konstantní, např. u mlád'at je podstatně rychlejší a to proto, že se buňky v tomto období života nejdynamičtěji dělí (Pauliny *et al.*, 2006). Na konkrétní příklady studované na modelové skupině ptáků se zaměřím v kapitole 6.

## 4. MĚŘENÍ DÉLKY TELOMER

V současnosti se měření délky telomer provádí pomocí mnoha různých molekulárních metod, z nichž každá má své výhody, ale i nevýhody. Odlišují se od sebe zejména technickou a časovou náročností, množstvím získaných informací, nárokem na vybavení či finančním hlediskem. V této kapitole představím několik nejpoužívanějších metod. Vzhledem k tomu, že se tato bakalářská práce zaměřuje na ptáky, je ještě zapotřebí uvést, že se DNA pro měření délky telomer získává u nich obvykle přímo z krve. Ptáci totiž mají oproti jiným taxonům jaderné erytrocyty (Lucas a Jamroz, 1961).

### 4. 1 TRF (Terminal Restriction Fragment)

Analýza délky terminálně restrikčních fragmentů telomer (Harley *et al.*, 1990) je relativně jednoduchá metoda a považuje se za „zlatý standart“ pro měření telomer. Je určena k měření průměrné délky TRF vyprodukovaných štěpením DNA pomocí restrikčních enzymů. Telomerické sekvence jsou detekovány metodou hybridizace za použití radioaktivně značených oligonukleotidů (Grant *et al.*, 2001).

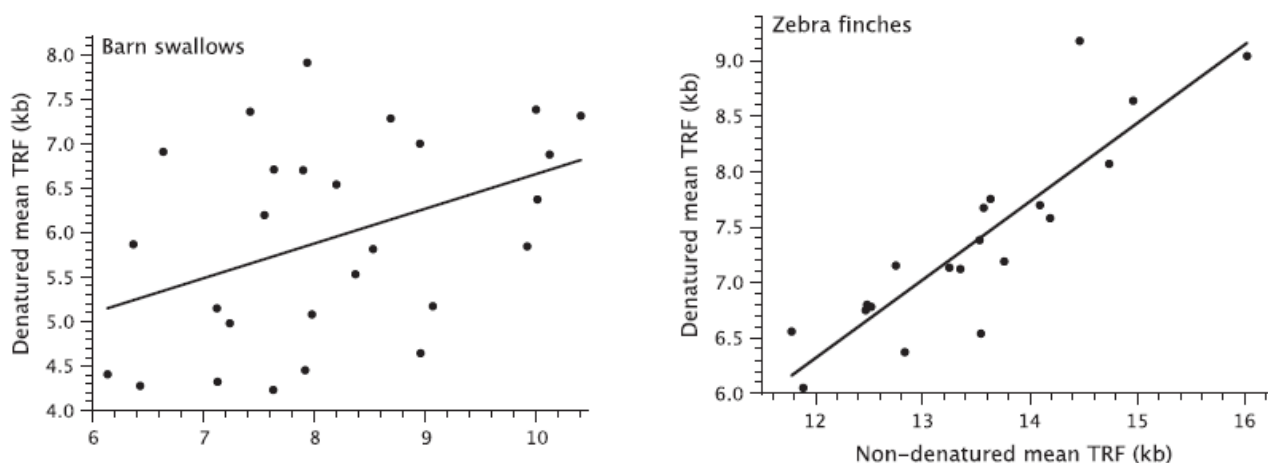
Hlavní výhodou je snadná měřitelnost distribuce délky telomer v kilobázích v každém vzorku DNA (Kimura, 2010). Nevýhodou tohoto přístupu je, že se délky terminálně restrikčních fragmentů mohou lišit mezi buňkami různého stáří i mezi různými chromozomy, které mohou mít rozdílná restrikční místa ve vztahu k telomerickým koncům (Grant *et al.*, 2001). Další nevýhoda spočívá v potřebě poměrně velkého množství DNA (0,5 – 5 µg na jedince) a také časové náročnosti celého procesu (3 – 5 dní). Průměrná délka TRF se zároveň může lišit až o 5% v závislosti na použitých restrikčních enzymech. To může naznačovat existenci polymorfních subtelomerických restrikčních míst a/nebo subtelomerických délek, které mohou zmást identifikaci primárních faktorů určování mezidruhové variability v průměrné délce pravé telomerické repetice (Cawthon 2002).

### 4. 2 Q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Kvantitativní PCR (někdy také real-time PCR) je v současnosti asi nejhojněji užívaná metoda založená na klasické PCR, která ale umožňuje kvantifikaci produktu již během reakce (proto tedy kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase).

Při použití této metody se množství amplifikované DNA měří po každém cyklu na základě intenzity fluorescenčního záření. Hodnota získaná amplifikací telomer (T) se vztahuje vždy k hodnotě referenčního genu, který se v genomu vyskytuje pouze v jedné kopii (tzv. single-copy gen, S). Výsledkem této analýzy je tedy tzv. T/S poměr, tedy relativní poměr sledovaného genu (v našem případě telomer) a referenčního genu sledovaného jedince ve srovnání s referenčním vzorkem, na rozdíl od klasické TRF, která určuje absolutní odhad průměru nebo rozsahu délky telomer v kb přítomných ve vzorku (Cawthon, 2002). Pokud je T/S poměr roven jedné znamená to, že se analyzovaná DNA neliší od referenčního vzorku v počtu kopií telomerických repetitiv (Cawthon, 2002).

Metoda Q-PCR vyžaduje poměrně malé množství DNA, což je hlavní výhodou u vzácných vzorků s omezeným množstvím krve (či tkáně). Také se zkrátila časová náročnost celého procesu a díky použití důmyslně upravených primerů už nedochází ke vzniku nežádoucích produktů, které mohou zkreslit výsledek (shrnutí v Nakagawa *et al.*, 2004; Nussey *et al.*, 2014). I přes všechny klady má ale i tato metoda své nevýhody. První z nich je, že neudává absolutní délku telomer, což můžeme ale vyřešit použitím obou metod (jak TRF, tak Q-PCR; Harley *et al.*, 1990). Dalším problémem je, že pomocí Q-PCR změříme nejen terminální telomerické úseky, ale také intersticiální = vmezeřené (úseky telomer v jiné, než koncové části chromozomu; Venkatesan a Price, 1998), což v rámci jedince vadit nemusí, pokud nás zajímá pouze tempo změny délky telomer, protože rozsah těchto intersticiálních telomerických úseků by se neměl měnit (shrnutí v Nakagawa *et al.*, 2004). V nedávné studii bylo nicméně zjištěno, že u některých druhů ptáků nastává problém při porovnání jedinců mezi sebou (Foote *et al.*, 2013). Délka intersticiálních úseků se může pohybovat od jednotek až po stovky kilobází (Lin a Yan, 2008), proto mohou značně ovlivnit výsledky měření (graf 2) a neměly by být ve studiích opomíjeny (Foote *et al.*, 2013).



*Graf 2: Vztah mezi průměrnou délkou TRF vypočítaných z nedenaturované DNA (skutečné – terminální telomery; osa x) a denaturované DNA (zahrnující intersticiální úseky; osa y) v kilobázích. Vlevo – vlaštovka obecná – nižší korelace; vpravo – zebříčka pestrá – vyšší korelace (převzato a upraveno z Foote et al., 2013).*

#### 4. 3 FISH metody

Dalšími dvěma možnostmi měření délky telomer jsou kvantitativní fluorescenční *in situ* hybridizace (Q-FISH; Zijlmans *et al.*, 1997) a průtoková cytometrie používající fluorescenční *in situ* hybridizaci (Flow-FISH; Rufer *et al.*, 1998). Telomery jsou označeny fluorescenčními barvivy a kvantifikovány měřením intenzity emitovaného záření.

Tyto metody jsou schopné změřit délku telomer z jednotlivých buněk – Flow-FISH využívá k roztrídění různých typů buněk fluorescenčně aktivované buněčné třídění, kdežto Q-FISH umožňuje měření délky telomer na jednotlivých chromozomech. Q-FISH však bohužel vizualizuje telomery pouze u metafázních chromozomů, což vyžaduje vzorek právě se dělících buněk. Takový vzorek je velice těžké získat zejména u volně žijících populací, které jsou ale momentálně v centru studia. Další nevýhodou těchto metod, zejména Q-FISH (Sedivy *et al.*, 2003), je, že je velmi těžké je zřídit v nesespecializovaných laboratořích. Proto existuje pouze málo případů, kdy by byl tento typ analýzy použit v oblasti ekologie či evoluce.

#### 4. 4 STELA (Single Telomere Length Analysis)

Tato metoda, která byla navržena teprve nedávno, je založena na klasickém PCR, ale na rozdíl od předchozích přístupů měří délku jednotlivých telomer (Baird *et al.*, 2003).

Baird a kol. (2003) zjistili, že je délka telomer odlišná u různých variant lidských pohlavních chromozomů, což by mohlo vysvětlovat rozdílnou rychlost stárnutí napříč lidskými populacemi (Perls *et al.*, 2002).

Vzhledem k tomu, že při použití této metody je nutné znát sekvenci subtelomerických oblastí, není STELA v současnosti příliš využívaným přístupem u nemodelových organismů. V poslední době však narůstá počet projektů zabývajících se sekvenováním genomů, a proto je více než pravděpodobné, že i tato metoda do budoucna najde své uplatnění.

#### 4.5 T-OLA (Telomeric-oligonucleotide Ligation Assays)

Pomocí této analýzy je možné měřit délku G-bohatých telomerických sekvencí v oblasti 3' přesahu pomocí ligace telomerických repetitivních oligonukleotidů, které jsou hybridizovány k těmto přesahům (Cimino-Reale *et al.*, 2001).

Zkracování telomer je přímo úměrné velikosti G-bohatých repetitivních sekvencí v lidských tkáních (Huffman *et al.*, 2000) a mohlo by to být obdobné i u jiných druhů savců. Toto tvrzení by však muselo být ověřeno s ohledem na rychlost zkracování délky telomer a maximální délku života (Hausmann *et al.*, 2003b), můžeme ale předpokládat, že dlouho žijící organismy budou mít kratší G-bohaté přesahy (jejich telomery se zkracují pomaleji), zatímco organismy žijící krátce budou mít přesahy delší (Huffman *et al.*, 2000). Není však zcela jasné, zda krátké přesahy znamenají pomalé zkracování telomer (tedy možnou delší dobu dožití) či velké množství buněk vstupujících do senescence (tedy předpověď kratší zbývajících délky života; Stewart *et al.*, 2003).

Následující tabulka znovu přehledně shrnuje všechny výše zmíněné metody:

Metoda	Podstata metody	Vyžadované množství buněk	Buňky měřené ve vzorku	Reference
TRF	Hybridizace	velké	všechny	Harley <i>et al.</i> , 1990
Q-PCR	PCR	malé	všechny	Cawthon, 2002
Q-FISH	Hybridizace	středně velké	jedna	Zijlmans <i>et al.</i> , 1997
Flow-FISH	Hybridizace	středně velké	jedna	Rufer <i>et al.</i> , 1998
STELA	PCR	malé	všechny	Baird <i>et al.</i> , 2003
T-OLA	Hybridizace	velké	všechny	Cimino-Reale <i>et al.</i> , 2001

*Tab. 1: Shrnutí v současnosti nejpoužívanějších metod pro měření délky telomer (a hybridizace je označení pro použití sondy specifické pro sekvenci TTAGGG, b množství*

*buněk potřebných pro analýzu převzato z Sedivy et al. 2003 – pro srovnání analýza TRF vyžaduje 5-10µg DNA, zatímco STELA pouze 50-100ng DNA). (Převzato a upraveno podle Nakagawa et al., 2004).*

## 5. TELOMERY JAKO BIOMARKERY STÁRNUTÍ

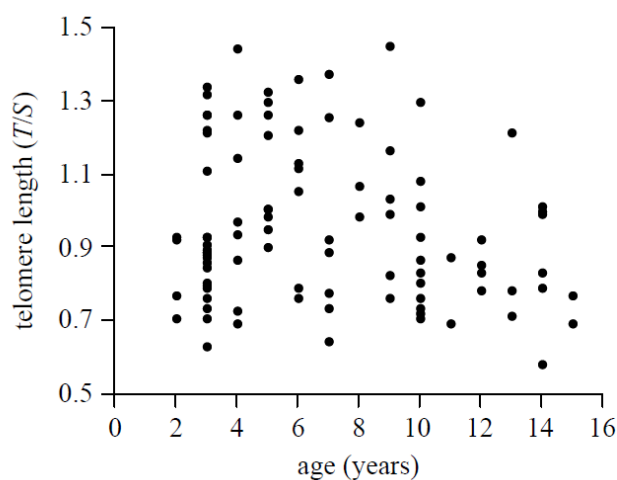
Věk jedince může být nesmírně důležitý při určování jeho fyziologického stavu za daných environmentálních podmínek. U většiny druhů ovlivňuje riziko zranění a nemocí, pravděpodobnost přežití a v neposlední řadě reprodukční potenciál. V rámci populace je pak věková struktura jedním z hlavních ukazatelů potenciálu jejího růstu (Vleck *et al.*, 2003). U lidí věk většinou známe díky rodnému listu, nicméně u divoce žijících zvířat může být zjištěn pouze na základě rozsáhlých studií a to ještě v omezené míře. Daný jedinec musí být sledován již od svého narození a označen (v případě ptáků např. kroužkem), případně může být věk zjištěn pomocí charakteristických morfologických struktur (Vleck *et al.*, 2003).

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3, telomery se obvykle v somatických tkáních s věkem zkracují. Hausmann a kol. (Hausmann & Vleck 2002; Hausmann *et al.*, 2003a; Vleck *et al.*, 2003) proto navrhli, že by mohlo být možné na základě délky telomer odhadovat věk a získat tak tolik potřebnou informaci o stárnutí a míře přežívání v přirozených populacích, kde jsou longitudinální studie nedostačující. Terminální restriční fragmenty (TRF) z krevních vzorků se u některých druhů ptáků skutečně zkracují [např. u zebřičky pestré, *Taeniopygia guttata* (Hausmann & Vleck, 2002), rybáka obecného, *Sterna hirundo* (Hausmann *et al.*, 2003a), vlaštovky stromové, *Tachycineta bicolor* nebo tučňáka kroužkového, *Pygoscelis adeliae* (Vleck *et al.*, 2003)]. Studie prokázaly vztah mezi délkou telomer a věkem organismu na vnitrodruhové úrovni a vztah mezi rychlostí zkracování telomer a potenciální délkou života napříč druhy – dlouhověkým se telomery zkracují podstatně pomaleji než krátkověkým. Druhé zjištění vedlo k domněnce, že se možná délka života a regulace délky telomer vyvinuly společně, takže se replikační potenciál buněk dané linie zvyšuje úměrně s délkou života. (Hausmann *et al.*, 2003b; Vleck *et al.*, 2003).

Odhadování věku na základě délky telomer je sice slibnou hypotézou, neobejde se ale bez některých problémů. Existuje velká variabilita v délce telomer a míry jejich

zkracování napříč druhy, mezi jedinci stejného druhu a také mezi tkáněmi stejného jedince. Tyto rozdíly způsobuje např. rozdílná počáteční délka telomer, míra buněčného dělení, úroveň aktivity telomerázy či úroveň oxidačního stresu (Monaghan & Haussmann, 2006). Taylor a Delany (2000) zkoumali aktivitu telomerázy u kura domácího (*Gallus gallus*) od rané diferenciacie embryí až po dospělost. Aktivita telomerázy byla detekována ve všech raných stádiích embryí (od preblastuly až po neurulu) a také v tkáních během organogeneze. Poté byl pozorován útlum její aktivity ve většině somatických tkání a to buď pre- nebo postnatálně. Některé tkáně (střevo, imunitní či reprodukční orgány) však vykazovaly stálou aktivitu. Důsledkem utlumení aktivity telomerázy začalo docházet ke zkracování telomer (Taylor a Delany, 2000).

Délka telomer tedy v některých případech koreluje s chronologickým věkem (skutečný věk jedince daný časem, který uběhl od jeho narození), ale neurčuje ho vždy spolehlivě (Nakagawa *et al.*, 2004). Příkladem toho, že se telomery pro určování chronologického věku příliš nehodí, může být studie z roku 2009, v níž autoři zkoumali rorýse velké (*Apus melba*) a prokázali vysokou variabilitu v délce telomer nezávisle na skutečném věku jedince (graf 3; Bize *et al.*, 2009).



Graf 3: Variabilita délky telomer (osa y) v daném věku (osa x) u 96 dospělých rorýsů velkých (převzato z Bize *et al.*, 2009).

Proto by telomery mohly být užitečné spíše jako indikátory tzv. biologického věku (Aviv, 2002a; Harley *et al.*, 1992). Koncept biologického věku byl formulován v důsledku rozdílných délek života v rámci druhu, přičemž biologický věk udává, v jakém stavu se



organismus nachází v závislosti na různých faktorech, jak vnějších (životní podmínky, stravovací návyky apod.), tak vnitřních (stres, oxidativní poškození a další). Řada těchto faktorů má na délku telomer vliv, tudíž délka telomer vlastně mapuje historii jedince, a proto by mohla být užitečná při odhadování biologického věku (Aviv *et al.*, 2003; Monaghan & Haussmann, 2006).

## 6. DYNAMIKA DÉLKY TELOMER

Vzhledem k tomu, že na délku telomer má vliv celá řada faktorů, je jejich zkoumání (zejména v posledních letech) ve velké oblibě a přibývá studií zabývajících se změnou délky telomer, zejména příčinami této změny, ale také důsledky z toho plynoucími. V následujících podkapitolách se zaměřím na nejstudovanější faktory ovlivňující dynamiku telomer u ptáků.

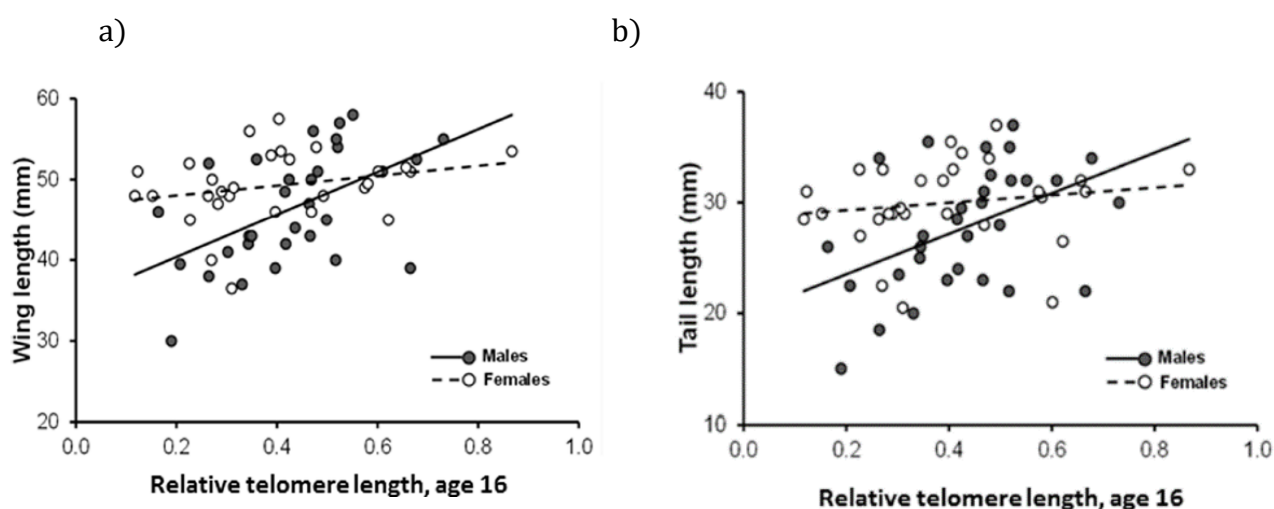
### 6. 1 Raná ontogeneze

Raná fáze života každého organismu je velmi náročná. Na jedné straně stojí investice do růstu těla a na straně druhé investice do samoudržovacích mechanismů. Růst samozřejmě znamená intenzivní dělení buněk, které vede k největší ztrátě telomer právě v tomto období života. Dynamice délky telomer v rané ontogenezi se proto věnuje celá řada studií. Salomons a kol. (2009) potvrdili největší úbytek telomerických sekvencí právě v prvním roce života nezávisle na pohlaví u kavek obecných (*Corvus monedula*). Jejich studie také jako první *in vivo* prokázala rychlejší zkracování dlouhých telomer oproti krátkým a to jak u mláďat, tak následně i dospělců. U jedinců s kratšími telomerami je navíc nižší pravděpodobnost odchytu v následujících letech, což možná poukazuje na zmenšenou pravděpodobnost jejich přežití. Ke stejnému výsledku došly i další nezávislé studie (např. Haussmann *et al.*, 2005; Pauliny *et al.*, 2006; Bize *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Heidinger *et al.*, 2012; Pauliny *et al.*, 2012). Bize a kol. (2009) navíc ve své studii prováděné na rorýsích velkých (*Apus melba*) poukazují na to, že právě pomalý úbytek relativně dlouhých telomer je klíčový a vede ke zvýšení pravděpodobnosti na dlouhý život.

Dalším parametrem, který hraje roli v rané ontogenezi, je pozice jedince v rámci snůšky. Ačkoliv nebyl nalezen efekt celkové velikosti snůšky na dynamiku telomer u špačků obecných (*Sturnus vulgaris*), velkou roli hrál počet silnějších soupeřů. Čím jich

bylo více, tím měl jedinec, který byl v hierarchii pod nimi, kratší telomery. Slabší soupeři přitom nehráli žádnou roli (Nettle *et al.*, 2013). Jelikož kratší telomery měli ptáci i po osamostatnění, je pravděpodobné, že postavení ve snůšce ovlivňuje celý budoucí život jedince, a že sociální stres v rané fázi života negativně působí na délku telomer (Nettle *et al.*, 2013; Boonekamp *et al.*, 2014). I tato zjištění zčásti podporují studii Salomonse a kol. (2009), nicméně ta tvrdí, že pouze samcům umístěným do experimentálně větších snůšek se rychleji zkracují telomery v rané fázi života. Navíc podle ní závisí na celkové velikosti snůšky a nejen na silnějších soupeřích, což podporuje i další studie, ve které autoři prokázali až 21% zvýšení úbytku telomer u jedinců kavky obecné (*Corvus monedula*), kteří pocházeli z experimentálně zvětšených snůšek. Tito jedinci byli navíc mnohem menší (Boonekamp *et al.*, 2014).

Dále byla zkoumána dynamika telomer v závislosti na pohlaví, růstu těla či opeření u holátek vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*). Velikost ocasu a letek byla větší u jedinců s delšími telomerami, přičemž byl tento vztah patrnější u samců (graf 4; Parolini *et al.*, 2015).

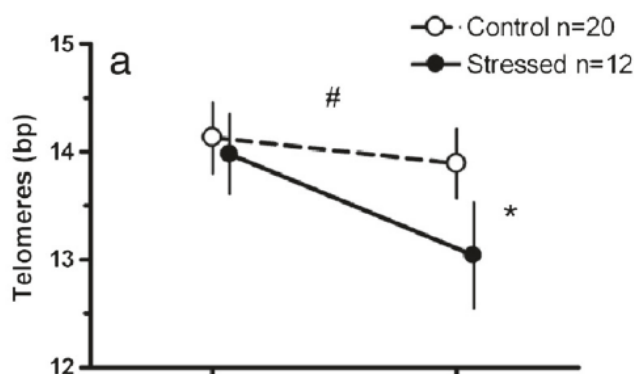


Graf 4: Relativní délka telomer ve věku 16 dnů (osa x) ve vztahu k a) délce letek (osa y), b) délce ocasu (osa y) u vlaštovek stromových (*Hirundo rustica*). Je patrné, že jedinci s delšími telomerami mají rovněž a) delší letky, b) delší ocasy, přičemž tento jev je patrnější u samců (rovná linie) než u samic (prerušovaná linie; převzato z Parolini *et al.*, 2015).

Velikosti těla (resp. jeho částí) v závislosti na délce telomer se věnuje i studie prováděná na samcích lesňáčka lejskovitého (*Setophaga ruticilla*). Jedinci byli rozděleni do dvou skupin – vylíhnutí danou sezónu anebo starší. Ptáci s delšími telomerami měli větší zobáky a to v případě obou skupin, obdobný vztah ale nebyl prokázán v případě délky tarzu. Je pravděpodobné, že větší zobák poskytuje jedinci výhody v podobě snadnějšího obstarání potravy. Autoři se domnívají, že jak délka telomer, tak velikost zobáků odráží podmínky, kterým byla mláďata vystavena v rané fázi života (Angelier *et al.*, 2015).

## 6. 2 Stres

Stres je dalším faktorem ovlivňujícím dynamiku telomer. Jak již bylo nastíněno v předešlé podkapitole, významný vliv na budoucí život jedince může mít především sociální stres v rané fázi života. Ten ovlivňuje hlavně mláďata krmivých ptáků – menší jedinci se musí více snažit, aby zaujali pozornost rodičů a byli nakrmeni. V minulosti bylo provedeno několik experimentálních studií zkoumajících účinek chronického stresu na potenciální biomarkery věku, mezi které mimo délky telomer patří např. ještě hladina oxidativního poškození či glukokortikoidní hormony. Hau a kol. (2015) vystavovali kombinaci imunitních a rušivých stresorů skupinu v zajetí chovaných kosů černých (*Turdus merula*) po více než jeden rok. Imunitní stresor představovala dávka LPS (lipopolysacharidu) vstříknutá pomocí injekce do prsního svalu jedinců, což vyvolalo akutní odpověď organismu zahrnující horečku. Rušivý stresor tvořila čtveřice náhodně se opakujících událostí – 30 minut „nahánění“ (mávání nápadnou sítí v okolí klece); umístění 2-3 dalších jedinců do klece po 30 minut, držení ptáka jednu hodinu v plátěném pytlíku a hodina hlasitého hraní rádia v místnosti s klecí. Ke všem těmto událostem docházelo za denního světla po dobu deseti po sobě následujících dnů. Jedinci vystavení stresovým faktorům vykazovali kromě zvýšeného oxidativního poškození plazmy také rychlejší úbytek telomerických sekvencí a to po celou dobu trvání experimentu (graf 5). Tato studie jako jedna z prvních dokazuje, že nejen stres v rané fázi života, ale i později v dospělosti, má vliv na dynamiku telomer a urychluje buněčné stárnutí. Přestože autoři studie nebyli schopni sledovat přežívání jedinců, předpokládají, že jedinci vystaveni stresorům trpěli zvýšenou mírou mortality. Pokus by bylo nicméně vhodné provést znovu a v přírodních podmínkách, neboť tam jsou jedinci vystaveni ještě dalším přirozeným stresorům (jako je sociální interakce, tlak ze strany predátorů, infekce, parazitace, lidská přítomnost či znečištění), které mohou ovlivnit výsledek studie (Hau *et al.*, 2015).



*Graf 5: Dlouhodobý efekt působení stresorů na potenciální biomarker – délku telomer. Na ose x najdeme dva body – začátek a konec experimentu, na ose y – délku telomer (udanou v počtu párů bází). Přerušovaná linie znázorňuje kontrolní skupinu, které se telomery zkracovaly méně než skupině vystavené stresu (nepřerušovaná linie; převzato z Hau et al., 2015).*

Urychlení zkracování telomer způsobuje i oxidativní stres, protože zvyšuje počet jednovláknových zlomů, což vede ke ztrátě koncových telomerických fragmentů (von Zglinicki *et al.*, 2002). Míra oxidativního stresu narůstá během reprodukce, což je jev, kterému bych z hlediska dynamiky telomer chtěla věnovat následující podkapitolu.

### 6. 3 Reprodukce

Reprodukce (neboli rozmnožování) je metabolicky nákladná aktivita, která zvyšuje úbytek telomer, pakliže během ní není jedinec schopen regulovat antioxidační obranu a/nebo aktivovat procesy obnovující telomery do požadované délky. Jelikož jedinci upravují své reprodukční úsilí na základě svých fyziologických možností, experimentální manipulace jsou nezbytné, chceme-li zjistit příčinu tohoto úbytku (Heidinger *et al.*, 2012). U modelového ptačího organismu – zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*) došlo při zapojení se do reprodukce během 25. dne a prvního roku života k urychlení zkracování telomer a to nezávisle na počtu sexuálních aktů či velikosti snůšky. Jednoletí jedinci, kteří se během svého života rozmnožovali, měli tedy prokazatelně kratší telomery. Tento efekt nicméně nepřetrval a při následném měření (ve třech letech) se vytratil a neovlivnil míru přežití (Heidinger *et al.*, 2012). Zebřičky zkoumal i další tým.

Experimentálně manipulovali velikost snůšky, aby změnili investici rodičů a to buď nad anebo pod jejich optimální stav. Prokázali, že zvýšení velikosti snůšky vede k redukci telomerických sekvencí u obou rodičů oproti kontrole a rodičům s menší snůškou. Úbytek byl detekován těsně po naklazení a změna v délce telomer přetrvala jako v předchozím případě jeden rok. Ani tentokrát nebyla ovlivněna následná délka života jedinců držených v laboratorních podmínkách (Reichert *et al.*, 2014). I výsledky výzkumu rybáka obecného (*Sterna hirundo*) prokázaly, že rodiče pečující o potomstvo vykazují vyšší ztrátu telomer oproti jedincům bez mlád'at (Bauch *et al.*, 2013). Naproti tomu žádný efekt zvýšené míry reprodukce na délku telomer nebyl objeven u tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), což může být ale způsobeno tím, že experimentální manipulace dostatečně nezvýšila míru oxidativního stresu tohoto poměrně dlouhověkého druhu (Beaulieu *et al.*, 2011).

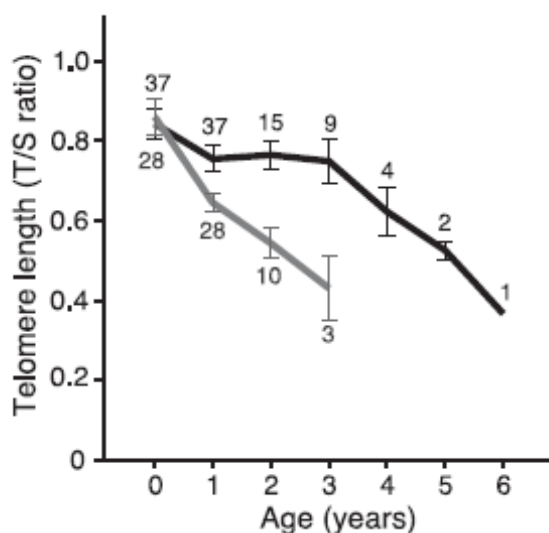
#### 6. 4 Strava

Důležitou roli hraje před a v době rozmnožování strava. Pokud potravy není dostatek, mnoho druhů se k reprodukci v danou chvíli ani neuchýlí a raději investují do přežití (Wade *et al.*, 1996). Strava musí být bohatá na antioxidační látky (které jsou nejvíce obsaženy v mikroprvcích), což hraje důležitou roli také při ochraně telomer (Noguera *et al.*, 2015). Studie, jež experimentálně manipulovala stravu mladých zebříček pestrých, sice nenašla žádný efekt mikroprvků na ztrátu telomer během růstu jedinců, zato však prokázala, že upravení stravy samic v období páření snižuje míru zkracování telomer. Stejný účinek ovšem nebyl nalezen u samců. Pozitivní účinek antioxidantů na zmenšení zkracování telomer prokázala i studie u skupiny sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*). U jedinců, kterým byly podány antioxidační látky (vitamín E a methionin) činil úbytek telomer jen asi 6,5 % oproti kontrolní skupině, kde to bylo 16 % (Badás *et al.*, 2015). Mikroprvky bohaté na antioxidanty tedy zjevně hrají nějakou roli při buněčném stárnutí a mohou ovlivnit jeho rychlost, je ale nutné znát rozdíly v požadavcích v závislosti na pohlaví (Noguera *et al.*, 2015).

#### 6. 5 Onemocnění a parazitace

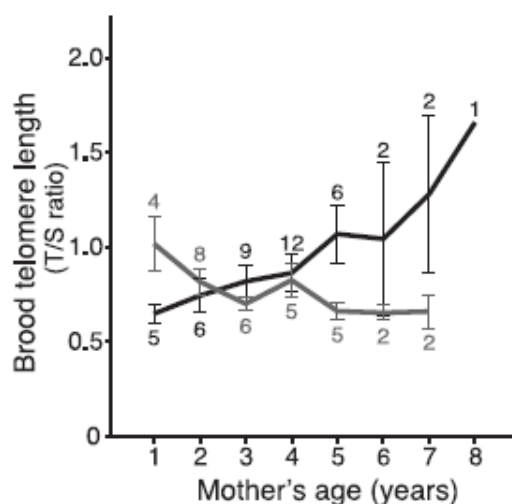
Za formu stresového faktoru by se vedle reprodukce dala považovat i různá onemocnění či parazitace. Reprodukce dokonce může zvýšit riziko infekce, neboť při ní dochází k oslabení imunitního systému a tedy ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů (Møller *et al.*, 2003). U ptáků je celkem běžným onemocněním malárie, u níž bylo

prokázáno, že ovlivňuje dynamiku telomer. Pakliže ptáci přežijí akutní fázi onemocnění, přejde buď do chronické podoby, nebo infekce z těla zmizí. Ashgar a kol., (2015) zkoumali vliv malárie na délku telomer, potažmo na délku života u divoké populace rákosníků velkých (*Acrocephalus arundinaceus*). Krev byla odebrána skupině zdravých i infikovaných jedinců, přičemž nemocní ptáci vykazovali mnohem výraznější zkracování telomer oproti zdravým. Pro potvrzení hypotézy byla pak provedena infekce části zdravých jedinců malarickým kmenem *Plasmodium ashfordi*, což je jeden ze tří nejběžnějších krevních parazitů rákosníků velkých. I v tomto případě se telomery infikovaných jedinců zkracovaly v mnohem větší míře (graf 6) a v dlouhodobém měřítku měla malárie negativní vliv na stárnutí (Ashgar *et al.*, 2015).



Graf 6: Zkracování délky telomer (osa y) s věkem (osa x) u rákosníka velkého. Infikovaní jedinci (šedá linie) vykazují větší ztrátu telomerických sekvencí než zdraví (černá linie; převzato a upraveno z Ashgar a kol., 2015).

Studie rovněž prokázala, že dynamiku telomer potomků mohou velmi silně ovlivnit životní podmínky rodičů. Matky infikované malárií měly potomky s průměrně kratšími telomerami než matky neinfikované; u otců však toto pozorováno nebylo. Čím byly neinfikované matky starší, tím měly potomky s průměrně delšími telomerami, naopak čím starší byly matky infikované, tím měli jejich potomci telomery kratší (graf 7; Asghar *et al.*, 2015).



Graf 7: Vztah mezi věkem matky (osa x) a délkou telomer u jejích potomků (osa y). Zdravé matky (černá linie) měly s přibývajícím věkem potomky s delšími telomerami, u infikovaných matek (šedá linie) tomu bylo naopak (převzato a upraveno z Ashgar a kol., 2015).

Rychlejší zkracování telomer jedinců infikovaných malárií bylo potvrzeno i u čížků lesních (*Spinus spinus*), u kterých bylo navíc prokázáno, že infekce vede k paralelnímu zkracování telomer v krvi a dalších tkáních různých orgánů (jater, plic, sleziny, srdce a ledvin; Asghar *et al.*, 2016). Zmírnění ztráty telomerických sekvencí vlivem onemocnění nicméně mohou napomoci antimalarika (Badás *et al.*, 2015).

## 6. 6 Dědičnost

Jak již bylo zmíněno v podkapitole 6. 1., délka telomer mlád'at podle mnoha studií určuje potenciální délku života (např. Haussmann *et al.*, 2005; Pauliny *et al.*, 2006; Bize *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Heidinger *et al.*, 2012; Pauliny *et al.*, 2012). Je proto nezbytné zjistit, jestli iniciální (počáteční) délku telomer ovlivňuje genetika, tedy do jaké míry jsou

telomery vlastně děděny. Studií na toto téma je nicméně v současnosti málo a pouze dvě prokázaly nějaký takový vztah u ptáků. U kakapů sovích (*Strigops habroptilus*) byl nalezen vztah mezi počáteční délkou telomer synů a jejich matek (Horn *et al.*, 2011). Samice jsou v případě kakapů heterogametickým pohlavím (ZW), tudíž výsledek koreluje s objevy u lidí, kdy také došlo k dědičnosti délky telomer od heterogametického pohlaví (mužského) na homogametické potomstvo (ženské; Nordfjall *et al.*, 2005). Druhá studie byla provedena na tučňácích patagonských (*Aptenodytes patagonicus*), přičemž byl zkoumán jak maternální tak paternální vliv na délku telomer mlád'at. Při prvním měření (v 10 dnech po vylíhnutí) byl prokázán vztah mezi iniciální délkou telomer potomků a matek. Při dalších měřeních (v 70, 200 a 300 dnech života) se nicméně vytratil, což naznačuje, že délka telomer je sice pravděpodobně do jisté mírně maternálně děděna (alespoň v případě tučňáků), ale vliv vnějších podmínek v období růstu ji výrazně mění a vliv dědičnosti se s věkem vytrácí (Reichert *et al.*, 2015).

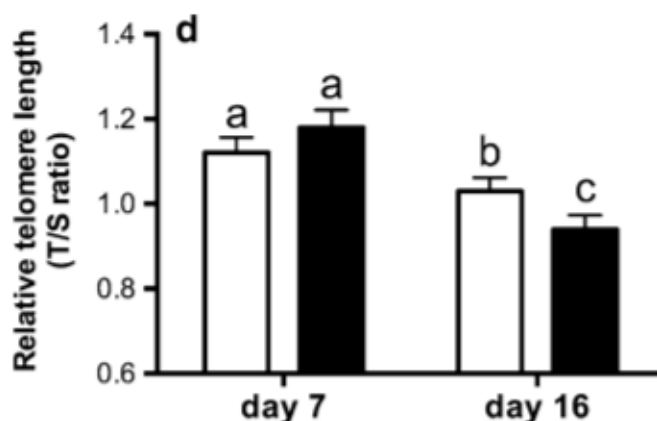
K podobnému výsledku došli i autoři studie prováděné na populaci skorce vodního (*Cinclus cinclus*), kteří měli k dispozici dlouhodobá data, pomocí nichž mohli vytvořit několikagenerační rodokmen. Přestože byla objevena jistá souvislost mezi relativní délkou telomer matky a jejích potomků, míra dědičnosti nebyla dostatečně signifikantní (Becker *et al.*, 2015). Míra dědičnosti délky telomer byla zkoumána i na modelové skupině – zebříčkách pestrých (*Taenopygia guttata*) chovaných v zajetí. I výsledky této studie naznačují, že jistá podobnost v délce telomer mezi příbuznými existuje, není ovšem jasné, jestli to způsobuje dědičnost nebo vliv vnějších faktorů (Atema *et al.*, 2015).

## 6. 7 Vnější podmínky

V předchozí kapitole bylo naznačeno, že podmínky prostředí, ve kterých jedinec žije, jsou dalším důležitým faktorem, který může významně ovlivnit dynamiku telomer a to opět zejména v rané fázi života. Watson a kol. (2015) zkoumali během dvou rozdílných hnízdních sezón mlád'ata buňňáčků malých (*Hydrobates pelagicus*). Jedinci, kteří se narodili v nepříznivé sezóně (s extrémními výkyvy počasí a méně kvalitními zdroji potravy) měli vyšší úbytek telomer oproti mlád'atům vylíhlým v příznivějších podmínkách. Navíc byla v této skupině prokázána vyšší úmrtnost mlád'at, což znovu poukazuje na závislost mezi délkou telomer během rané ontogeneze a potenciální délkou života (Watson *et al.*, 2015).



To, že podmínky, v jakých se jedinec nachází v rámci snůšky, ovlivňuje délku telomer, jsem zmiňovala částečně již v podkapitole 6. 1. Na dynamiku telomer, kromě těch již zmíněných, má vliv ještě další vnější faktor, a sice asynchronní sezení na snůšce (Stier *et al.*, 2015). Sýkora koňadra (*Parus major*) je jedním z druhů, kteří se takovouto asynchronitou vyznačují. Samice začíná sedět na snůšce ještě předtím, než naklade poslední vajíčka, tudíž se mlád'ata obvykle nelíhnou současně. To poskytuje dříve vylíhnutým jedincům výhodu zejména, co se týče potravy. Stier a kol. (2015) se ve své studii zaměřili na dvě nejstarší a dvě nejmladší mlád'ata ze snůšky, přičemž zkoumali nejen dynamiku telomer, ale také další parametry, jako např. odlišnosti v růstu či oxidativní stres. Velikost i celková váha později narozených jedinců se ukázala být na začátku skutečně menší, nicméně při následném měření (v 16 dnech po vylíhnutí) byl rozdíl smazán. Tato mlád'ata za to ovšem zaplatila vyšším obsahem kyslíkových radikálů v krvi, protože jim v důsledku investice do růstu klesla kapacita antioxidantů v plazmě. To vedlo k vyššímu úbytku telomer v 16. den života oproti dříve vylíhlym mlád'atům, přestože tento efekt ještě v sedmý den života nebyl patrný (graf 8). Dle výsledků této studie patrně u mladších jedinců dochází k trade-off mezi investicí do růstu a údržbou organismu, za což jedinci platí vyšší mírou oxidativního stresu a následně vyšším úbytkem telomerických sekvencí (Stier *et al.*, 2015).



Graf 8: Vliv doby vylíhnutí (první – bílý sloupec vs. poslední – černý sloupec vylíhlé mládě) a věku (7 vs. 16 dní – osa x) na délku telomer (osa y). Poslední vylíhlé mládě vykazuje oproti prvnímu vyšší úbytek telomer (převzato a upraveno ze Stier *et al.*, 2015).

## 6. 8 Chování

Výše jsem vypsala přehled nejstudovanějších faktorů ovlivňujících dynamiku telomer. Zajímavé je ale také zjištění, jaký má vlastně zkracování telomer vliv na budoucí chování jedince. Tomuto jevu se věnovala i výzkumná skupina, která testovala předpoklad, že pokud je narůstající ztráta telomer prediktorem délky života, měli by jedinci s kratšími telomerami činit impulzivnější rozhodnutí, zejména co se týče shánění potravy. Narůstající úbytek telomer i kratší absolutní délka telomer u špačků obecných (*Sturnus vulgaris*) skutečně předpovídala impulzivnější chování. Jedinci, kteří měli mezi 4. a 55. dnem po vylíhnutí větší úbytek telomerických sekvencí a ti, jež měli v 55 dnech kratší telomery, preferovali rychlý zdroj malého množství potravy. Špačci s menším úbytkem či delšími telomerami dali naopak přednost velkému množství potravy, které ale nebylo okamžité (Bateson *et al.*, 2015).

Změny chování závislé na délce telomer byly pozorovány i na skupině alkounů tlustozobých (*Uria lomvia*). Samci těchto dlouhověkých mořských ptáků s kratšími telomerami preferovali shánění potravy v teplejších vodách (u samic toto pozorováno nebylo). Tito jedinci se také potápěli do větších hloubek, což je pro ně sice riskantnější a fyziologicky náročnější, zvyšuje to však pravděpodobnost ulovení kořisti. Je ale možné, že alkouni s kratšími telomerami byli prostě jen starší a tudíž zkušenější. Každopádně z této studie plyne, že jedinci s kratšími telomerami dokáží účinněji využívat okolní zdroje (Young *et al.*, 2015).

## 7. ZÁVĚR

Výzkumu telomer je zejména v posledních letech věnováno velké úsilí a to hlavně proto, že se jedná o potenciálně atraktivní ukazatel stárnutí. Telomery se s přibývajícím věkem zkracují, což prokázalo poměrně značné množství studií – já jsem se ve své práci věnovala pouze studiím zabývajícím se tímto jevem u ptáků, u kterých bylo prokázáno, že více než na absolutní délce telomer záleží na rychlosti jejich úbytku (např. Haussmann *et al.*, 2005; Pauliny *et al.*, 2006; Bize *et al.*, 2009; Salomons *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Heidinger *et al.*, 2012; Pauliny *et al.*, 2012). Nezdá se pravděpodobné, že by se telomery hodily pro určování chronologického věku (tedy skutečného stáří organismu), neboť se jejich délka může lišit u stejně starých jedinců daného druhu (např. Bize *et al.*, 2009). Z toho důvodu bylo navrženo, že se spíše hodí pro odhadování biologického věku (ten udává, v jakém stavu se organismus nachází v důsledku působení různých faktorů; Aviv, 2002a; Harley *et al.*, 1992). Délka telomer v podstatě mapuje historii jedince, protože na ni má vliv celá řada faktorů, kterým byl jedinec v průběhu svého života vystaven, ať už se jedná (v případě ptáků) o pozici v rámci snůšky (např. Nettle *et al.*, 2013; Boonekamp *et al.*, 2014), o zapojení se do reprodukce (např. Heidinger *et al.*, 2012; Reichert *et al.*, 2014), o různé infekce či onemocnění (např. Asghar *et al.*, 2015) a další. Všechny tyto události vedou ke zkracování telomer a tedy, jak prokázala řada studií, ke snížení potenciální délky života (např. Haussmann *et al.*, 2005; Pauliny *et al.*, 2006; Bize *et al.*, 2009; Salomons *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Heidinger *et al.*, 2012; Pauliny *et al.*, 2012). Raná ontogeneze nicméně zůstává z hlediska dynamiky telomer klíčová, protože v tomto období dochází k nejvýraznějšímu zkracování telomer, proto by se studie měly nadále věnovat zejména tomuto období. Některé faktory dosud nebyly dostatečně probádány, tudíž rozsáhlé dlouhodobé studie především u divoce žijících populací ptáků by snad napomohly tento zajímavý jev osvětlit.

Mimo dynamiku délky telomer jsem ve své bakalářské práci shrnula i přehled v současnosti nejpoužívanějších molekulárních metod pro jejich měření. Každá z nich má své výhody, ale i nevýhody. Odlišují se od sebe zejména technickou a časovou náročností, množstvím získaných informací, nárokem na vybavení či finančním hlediskem. Úplně nejpoužívanější metodou pro stanovení délky telomer u ptáků je v současné době qPCR. Její použití je poměrně jednoduché, rychlé a časově i finančně nepříliš náročné, přesto má i ona své nevýhody. Jednou z nich je, že poskytuje výsledky pouze v relativní, nikoliv

absolutní hodnotě (Cawthon, 2002). Důležitější je, že při použití qPCR není možné odlišit intersticiální úseky od klasických telomer, což může ovlivnit výsledky měření (Foote *et al.*, 2013). Dále je zapotřebí vybrat vhodný referenční marker a následně navrhnout vysoce specifický primer tak, aby byla efektivita metody co největší. Sníží-li se finanční a technické nároky některých dalších metod (např. FISH nebo STELA), lze očekávat, že bude jejich užití v budoucnu hojnější.

## 8. LITERÁRNÍ ZDROJE

- Angelier, F., Vleck, C. M., Holberton, R. L., & Marra, P. P. (2015). Bill size correlates with telomere length in male American Redstarts. *Journal of Ornithology*, 156(2), 525-531.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Hansson, B., Zehtindjiev, P., Westerdahl, H., & Bensch, S. (2015). Hidden costs of infection: chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science*, 347(6220), 436-438.
- Asghar, M., Palinauskas, V., Zaghdoudi-Allan, N., Valkiūnas, G., Mukhin, A., Platonova, E., ... & Hasselquist, D. (2016, August). Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 283, No. 1836, p. 20161184). The Royal Society.
- Atema, E., Mulder, E., Dugdale, H. L., Briga, M., van Noordwijk, A. J., & Verhulst, S. (2015). Heritability of telomere length in the Zebra Finch. *Journal of Ornithology*, 156(4), 1113-1123.
- Aviv, A. (2002). Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *Journal of Molecular Medicine*, 80(11), 689-695.
- Aviv, A., Levy, D., & Mangel, M. (2003). Growth, telomere dynamics and successful and unsuccessful human aging. *Mechanisms of ageing and development*, 124(7), 829-837.
- Badás, E. P., Martínez, J., Rivero de Aguilar Cachafeiro, J., Miranda, F., Figuerola, J., & Merino, S. (2015). Ageing and reproduction: antioxidant supplementation alleviates telomere loss in wild birds. *Journal of evolutionary biology*, 28(4), 896-905.
- Baird, D. M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., & Kipling, D. (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature genetics*, 33(2), 203-207.
- Bateson, M., Brilot, B. O., Gillespie, R., Monaghan, P., & Nettle, D. (2015). Developmental telomere attrition predicts impulsive decision-making in adult starlings. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 282(1799), 20142140.
- Bauch, C., Becker, P. H., & Verhulst, S. (2013, February). Telomere length reflects phenotypic quality and costs of reproduction in a long-lived seabird. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 280, No. 1752, p. 20122540). The Royal Society.
- Beaulieu, M., Reichert, S., Le Maho, Y., Ancel, A., & Criscuolo, F. (2011). Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. *Functional Ecology*, 25(3), 577-585.
- Becker, P. J., Reichert, S., Zahn, S., Hegelbach, J., Massemin, S., Keller, L. F., ... & Criscuolo, F. (2015, May). Mother-offspring and nest-mate resemblance but no heritability in early-life telomere length in white-throated dippers. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 282, No. 1807, p. 20142924). The Royal Society.
- Bize, P., Criscuolo, F., Metcalfe, N. B., Nasir, L., & Monaghan, P. (2009). Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1662), 1679-1683.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569.

- Blanco, M. A., & Sherman, P. W. (2005). Maximum longevity of chemically protected and non-protected fishes, reptiles, and amphibians support evolutionary hypotheses of aging. *Mechanisms of ageing and development*, 126(6), 794-803.
- Boonekamp, J. J., Mulder, G. A., Salomons, H. M., Dijkstra, C., & Verhulst, S. (2014). Nestling telomere shortening, but not telomere length, reflects developmental stress and predicts survival in wild birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 281(1785), 20133287.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., & de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature genetics*, 17(2), 231-235.
- Brunet-Rossinni, A. K., & Austad, S. N. (2004). Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology*, 5(4), 211-222.
- Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), e47-e47.
- Cimino-Reale, G., Pascale, E., Battiloro, E., Starace, G., Verna, R., & D'Ambrosio, E. (2001). The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. *Nucleic acids research*, 29(7), e35-e35.
- Cohen, J. E., Pimm, S. L., Yodzis, P., & Saldana, J. (1993). Body sizes of animal predators and animal prey in food webs. *Journal of animal ecology*, 67-78.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Foote, C. G., Vleck, D., & Vleck, C. M. (2013). Extent and variability of interstitial telomeric sequences and their effects on estimates of telomere length. *Molecular ecology resources*, 13(3), 417-428.
- Grant, J. D., Broccoli, D., Muquit, M., Manion, F. J., Tisdall, J., & Ochs, M. F. (2001). Telometric: a tool providing simplified, reproducible measurements of telomeric DNA from constant field agarose gels. *Biotechniques*, 31(6), 1314-1319.
- Hamilton, W. D. (1966). The moulding of senescence by natural selection. *Journal of theoretical biology*, 12(1), 12-45.
- Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M., & Allsopp, R. C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental gerontology*, 27(4), 375-382.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458.
- Harman, D. (2006). Free radical theory of aging: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 10-21.
- Hau, M., Haussmann, M. F., Greives, T. J., Matlack, C., Costantini, D., Quetting, M., ... & Partecke, J. (2015). Repeated stressors in adulthood increase the rate of biological ageing. *Frontiers in zoology*, 12(1), 4.
- Haussmann, M. F., & Marchetto, N. M. (2010). Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Current Zoology*, 56(6).
- Haussmann, M. F., & Vleck, C. M. (2002). Telomere length provides a new technique for aging animals. *Oecologia*, 130(3), 325-328.
- Haussmann, M. F., Vleck, C. M., & Nisbet, I. C. (2003). Calibrating the telomere clock in common terns, *Sterna hirundo*. *Experimental gerontology*, 38(7), 787-789.
- Haussmann, M. F., Winkler, D. W., O'Reilly, K. M., Huntington, C. E., Nisbet, I. C., & Vleck, C. M. (2003). Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1522), 1387-1392.

- Haussmann, M. F., Winkler, D. W., & Vleck, C. M. (2005). Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biology Letters*, 1(2), 212-214.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3), 585-621.
- Heidinger, B. J., Blount, J. D., Boner, W., Griffiths, K., Metcalfe, N. B., & Monaghan, P. (2012). Telomere length in early life predicts lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1743-1748.
- Horn, T., Robertson, B. C., Will, M., Eason, D. K., Elliott, G. P., & Gemmell, N. J. (2011). Inheritance of telomere length in a bird. *PLoS One*, 6(2), e17199.
- Huffman, K. E., Levene, S. D., Tesmer, V. M., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19719-19722.
- Hughes, K. A., & Reynolds, R. M. (2005). Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 421-445.
- Chen, H. Y., & Maklakov, A. A. (2012). Longer life span evolves under high rates of condition-dependent mortality. *Current Biology*, 22(22), 2140-2143.
- Jones, O. R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C. G., Schaible, R., Casper, B. B., ... & Quintana-Ascencio, P. F. (2014). Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*, 505(7482), 169-173.
- Keller, L., & Genoud, M. (1997). Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature*, 389(6654), 958-960.
- Kim, Y. J., Subramani, V. K., & Sohn, S. H. (2011). Age Prediction in the Chickens Using Telomere quantity by quantitative fluorescence in situ hybridization technique. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(5), 603-609.
- Kimura, M., Stone, R. C., Hunt, S. C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., ... & Aviv, A. (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature protocols*, 5(9), 1596-1607.
- Kirkwood, T. B. (1977). Evolution of ageing. *Nature*, 270, 301-304.
- Lambert, A. J., & Merry, B. J. (2004). Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(1), R71-R79.
- Lin, K. W., & Yan, J. (2008). Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(1), 95-110.
- Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., & Cech, T. R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276(5312), 561-567.
- Lucas, A. M., & Jamroz, C. (1961). Atlas of avian hematology. *Atlas of avian hematology*.
- McClintock, B. (1939). The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 25(8), 405-416.
- Medawar, P. B. (1952). *An unsolved problem of biology*. College.
- Meyne, J., Ratliff, R. L., & MoYzIs, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), 7049-7053.

- Miller, R. A., Harper, J. M., Dysko, R. C., Durkee, S. J., & Austad, S. N. (2002). Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Experimental Biology and Medicine*, 227(7), 500-508.
- Møller, A. P., Erritzøe, J., & Saino, N. (2003). Seasonal changes in immune response and parasite impact on hosts. *The American Naturalist*, 161(4), 657-671.
- Monaghan, P., & Haussmann, M. F. (2006). Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan?. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 47-53.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D. H., & Ricklefs, R. E. (2008). The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology*, 22(3), 371-378.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting net*, 13, 181-198.
- Nakagawa, S., Gemmell, N. J., & Burke, T. (2004). Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations. *Molecular Ecology*, 13(9), 2523-2533.
- Nettle, D., Monaghan, P., Boner, W., Gillespie, R., & Bateson, M. (2013). Bottom of the heap: having heavier competitors accelerates early-life telomere loss in the European starling, *Sturnus vulgaris*. *PLoS One*, 8(12), e83617.
- Noguera, J. C., Metcalfe, N. B., Boner, W., & Monaghan, P. (2015). Sex-dependent effects of nutrition on telomere dynamics in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Biology letters*, 11(2), 20140938.
- Nordfjäll, K., Larefalk, Å., Lindgren, P., Holmberg, D., & Roos, G. (2005). Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16374-16378.
- Nussey, D. H., Baird, D., Barrett, E., Boner, W., Fairlie, J., Gemmell, N., ... & Turbill, C. (2014). Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(4), 299-310.
- Parolini, M., Romano, A., Khoriauli, L., Nergadze, S. G., Caprioli, M., Rubolini, D., ... & Giulotto, E. (2015). Early-life telomere dynamics differ between the sexes and predict growth in the Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *PloS one*, 10(11), e0142530.
- Pauliny, A., Larsson, K., & Blomqvist, D. (2012). Telomere dynamics in a long-lived bird, the barnacle goose. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 257.
- Pauliny, A., Wagner, R. H., Augustin, J., Szép, T., & Blomqvist, D. (2006). Age-independent telomere length predicts fitness in two bird species. *Molecular Ecology*, 15(6), 1681-1687.
- Pearl, R. (1928). The rate of living.
- Perls, T. T., Wilmoth, J., Levenson, R., Drinkwater, M., Cohen, M., Bogan, H., ... & Puca, A. (2002). Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8442-8447.
- Reichert, S., Rojas, E. R., Zahn, S., Robin, J. P., Criscuolo, F., & Massemin, S. (2015). Maternal telomere length inheritance in the king penguin. *Heredity*, 114(1), 10-16.
- Reichert, S., Stier, A., Zahn, S., Arrivé, M., Bize, P., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 9.
- Ricklefs, R. E. (2008). The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology*, 22(3), 379-392.
- Ricklefs, R. E. (2010). Insights from comparative analyses of aging in birds and mammals. *Aging cell*, 9(2), 273-284.



- Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E., & Lansdorp, P. M. (1998). Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nature biotechnology*, 16(8), 743-747.
- Salo, P., Banks, P. B., Dickman, C. R., & Korpimäki, E. (2010). Predator manipulation experiments: impacts on populations of terrestrial vertebrate prey. *Ecological monographs*, 80(4), 531-546.
- Salomons, H. M., Mulder, G. V., van de Zande, L., Haussmann, M. F., Linskens, M. H., & Verhulst, S. (2009). Telomere shortening and survival in free-living corvids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1670), 3157-3165.
- Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., & Yan, J. (2010). Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 192(5), 284-291.
- Sedivy, J. M. (1998). Can ends justify the means?: telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9078-9081.
- Sedivy, J. M., Shippen, D. E., & Shakirov, E. V. (2003). Surprise ending. *nature genetics*, 33(2), 114-116.
- Shattuck, M. R., & Williams, S. A. (2010). Arboreality has allowed for the evolution of increased longevity in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4635-4639.
- Schultner, J., Moe, B., Chastel, O., Bech, C., & Kitaysky, A. S. (2014). Migration and stress during reproduction govern telomere dynamics in a seabird. *Biology letters*, 10(1), 20130889.
- Speakman, J. R., Selman, C., McLaren, J. S., & Harper, E. J. (2002). Living fast, dying when? The link between aging and energetics. *The Journal of nutrition*, 132(6), 1583S-1597S.
- Speakman, J. R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology*, 208(9), 1717-1730.
- Stewart, S. A., Ben-Porath, I., Carey, V. J., O'Connor, B. F., Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2003). Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature genetics*, 33(4), 492-496.
- Stier, A., Massemin, S., Zahn, S., Tissier, M. L., & Criscuolo, F. (2015). Starting with a handicap: effects of asynchronous hatching on growth rate, oxidative stress and telomere dynamics in free-living great tits. *Oecologia*, 179(4), 999-1010.
- Taylor, H. A., & Delany, M. E. (2000). Ontogeny of telomerase in chicken: Impact of downregulation on pre-and postnatal telomere length in vivo. *Development, growth & differentiation*, 42(6), 613-621.
- Troen, B. R. (2003). The biology of aging. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 70(1), 3-22.
- Turbill, C., Bieber, C., & Ruf, T. (2011, November). Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 278, No. 1723, pp. 3355-3363). The Royal Society.
- Valcu, M., Dale, J., Griesser, M., Nakagawa, S., & Kempenaers, B. (2014). Global gradients of avian longevity support the classic evolutionary theory of ageing. *Ecography*, 37(10), 930-938.

- Venkatesan, R. N., & Price, C. (1998). Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14763-14768.
- Vleck, C. M., Haussmann, M. F., & Vleck, D. (2003). The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process. *Experimental gerontology*, 38(7), 791-795.
- Vleck, C. M., Haussmann, M. F., & Vleck, D. (2007). Avian senescence: underlying mechanisms. *Journal of Ornithology*, 148(2), 611-624.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 339-344.
- von Zglinicki, T., Pilger, R., & Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1), 64-74.
- Wade, G. N., Schneider, J. E., & Li, H. Y. (1996). Control of fertility by metabolic cues. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 270(1), E1-E19.
- Wai, L. K. (2004). Telomeres, telomerase, and tumorigenesis—a review. *Med Gen Med*, 6(3), 19.
- Wasser, D. E., & Sherman, P. W. (2010). Avian longevities and their interpretation under evolutionary theories of senescence. *Journal of Zoology*, 280(2), 103-155.
- Watson, H., Bolton, M., & Monaghan, P. (2015). Variation in early-life telomere dynamics in a long-lived bird: links to environmental conditions and survival. *Journal of Experimental Biology*, 218(5), 668-674.
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11: 398-411. 1966 *Adaptation and Natural Selection*.
- Young, R. C., Kitaysky, A. S., Barger, C. P., Dorresteijn, I., Ito, M., & Watanuki, Y. (2015). Telomere length is a strong predictor of foraging behavior in a long-lived seabird. *Ecosphere*, 6(3), 1-26.
- Zijlmans, J. M. J., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., & Lansdorp, P. M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), 7423-7428.